

博士論文

低分子リガンドによる
細胞接着蛋白質の機能制御に関する研究

妹尾 暁暢

第1章 序論

蛋白質はその機能を発揮する際にホモマルチマーやヘテロマルチマーを形成することが多く、生命現象の根底には蛋白質同士の機能複合体形成

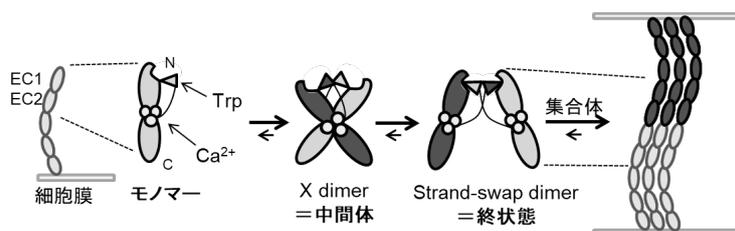


図1 P-カドヘリンによる段階的なホモ二量体形成と細胞接着

があると言うことができる¹。そのため蛋白質機能複合体の形成を制御する分子は、難病治療のための薬剤や機能解明のためのプローブとしての可能性をもつ。そうした蛋白質機能複合体の形成駆動力となっているのが蛋白質-蛋白質間相互作用(Protein-protein interaction; PPI)である。PPIにはいくつかの特徴がある。ひとつは、相互作用界面が広い(1000-3000 Å²)点、もうひとつは PPI が天然の基質リガンドを持たない(即ち、化合物が結合できる明確なポケットがない)点である²。こうした背景から PPI 制御分子として、広い相互作用界面と高度な分子認識能を発揮する抗体やペプチドといった高分子量の分子種が選択されることも多い。しかしながら、これらのモダリティには投与方法の制限や高コスト、細胞膜透過性の低さといった問題がある³。以上の背景から PPI を低分子で制御する有効な戦略が求められている。

本研究では、細胞接着蛋白質 P-カドヘリンによる蛋白質機能複合体形成を標的にこれを低分子で制御することを目的とした。P-カドヘリンは上皮細胞で広く発現している E-カドヘリンと同じクラシカルカドヘリン・I型に属する蛋白質である。通常細胞では一部組織でしか発現していないものの、大腸癌・膵臓癌・肺癌など様々な癌細胞において高発現している⁴。さらに、抗 P-カドヘリン抗体を用いた研究では、P-カドヘリンによる細胞接着は癌の浸潤や増殖を促進する作用があることが確認されている⁵。こうした背景より、P-カドヘリンの細胞接着を制御することは抗浸潤という観点から重要な抗癌戦略であると位置付けられている。細胞接着の分子基盤は細胞上でのカドヘリン分子のホモ二量体化である(図 1)。細胞外ドメインの 2 ドメイン(Extracellular domain 1-2; EC12)が中間体(X ダイマー)を経て、Strand-Swap ダイマー(S-S ダイマー)というホモ二量体を形成する⁶。このホモ二量体が細胞上でクラスター化することで細胞接着能が発揮される。S-S ダイマーにおいては蛋白質表面の疎水ポケットが相互作用に重要であることが知られている。そのため、カドヘリン制御分子の開発もその疎水ポケットに対するリガンド開発を主軸として進められてきた^{7,8}ものの、同ポケットへの結合が証明されたリガンドは存在しない。従って、P-カドヘリンを含むクラシカルカドヘリンの低分子による接着形成制御に向けた効果的な戦略は未知である。

第2章 SPR を用いた P-カドヘリンホモ二量体に対する低分子スクリーニング

本研究ではまず P-カドヘリンのモノマー変異体へ結合する低分子のスクリーニングを行った。化合物ライブラリーには東大創薬機構が保有する 20 万化合物の中から分子量 300 Da 以下の比較的小さな骨格を集めたライブラリーを用いた。センサーチップ上に固定化した

P-カドヘリンのモノマー変異体に対し、ライブラリー中の化合物を流し、得られた結合レスポンスが上位約 7%(144/1973 化合物)につき、結合活性を有する化合物として選抜した。続いて得られた化合物に対して、S-S ダイマーを形成するコンストラクト(EC12)をセンサーチップ上に固定化し、ABA アッセイと呼ばれる SPR の手法を用いてセンサーチップ上のダイマー形成を阻害する活性を示す化合物を選抜した。ABA アッセイにおいては 2 種類の溶液 A, B を連続的にセンサーチップ上に流す。溶液 A には固定化したものと同じ EC12 を、溶液 B には一次スクリーニングのヒット化合物を用いた。これにより溶液 A でセンサーチップ上に形成されたホモ二量体が溶液 B により解離されるかを検証した。この様な活性を示す化合物は 2 化合物存在したが、その内 1 化合物について、結合活性に関する濃度依存性が確認できたため、続く評価系にはその 1 化合物(Hit 1)を用いることとした(図 2)。

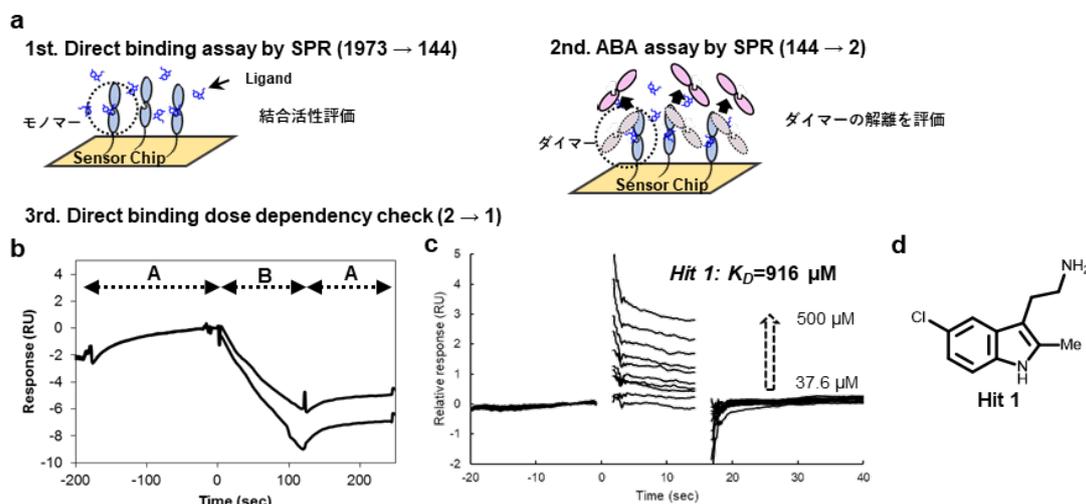


図2 SPRを用いたフラグメントスクリーニング。(a) スクリーニングの流れ。(b) ABAアッセイにおけるヒット化合物の特徴的なセンサグラム。(c) モノマー変異体に対する化合物の濃度依存的直接結合。(d) Hit 1の構造式。

第3章 ヒット化合物による細胞接着阻害機構の精密解析

Hit 1 の P-カドヘリン上での結合位置を特定するために X 線結晶構造解析を実施した。P-カドヘリンのモノマー変異体を結晶化し、この結晶を Hit 1 を含む結晶母液へと液浸した。その結果分解能 2.30 Å の Hit 1 とモノマー-P-カドヘリンの複合体結晶構造を得た。Hit 1 は EC1 ドメインと EC2 ドメインの間に結合していた(図 3a, b)。この結合位置は細胞接着過程において中間体のホモ二量体である X ダイマーの結合界面付近に位置していたため、Hit 1 は X ダイマーを制御している可能性が示唆された。この仮説を検証するために水素重水素交換質量分析法を用いて、X ダイマーの相互作用界面の溶媒への露出度をもとに Hit 1 の X ダイマー阻害試験を実施した。X ダイマーの結合界面に含まれるアミノ酸番号 134-147 の領域で Hit 1 の添加に伴い重水交換率が上昇し、この部分が Hit 1 添加時に溶媒へ露出することが分かった。以上から、Hit 1 は X ダイマーの平衡をモノマー側へと偏らせる作用があることが示唆された。加えて、Hit 1 による X ダイマーへの作用を精査するため、再び X 線結晶構造解析を実施した。X ダイマーのみを形成し、S-S ダイマーは形成しないコ

ンストラクト(MEC12)を結晶化し、Hit 1を含む結晶母液へ液浸することで解像度 2.45 Å の Hit 1 と X ダイマーの複合体結晶構造を得た。本構造は、Hit 1 が X ダイマー阻害剤であることを考えると Hit 1 が X ダイマーに作用する過程での準安定構造を捉えたものであると考えられる。Hit 1 の結合により X ダイマーに対するドラスティックな構造変化と、それに伴う X ダイマー形成に必要な水素結合の切断が確認された(図 3c)。Hit 1 はこの水素結合を直接的に阻害できる位置に結合しているわけではなかった。以上は、蛋白質に対する構造変化を誘起することで間接的に水素結合を切断し、X ダイマーの相互作用界面を不安定化したことを示唆する。

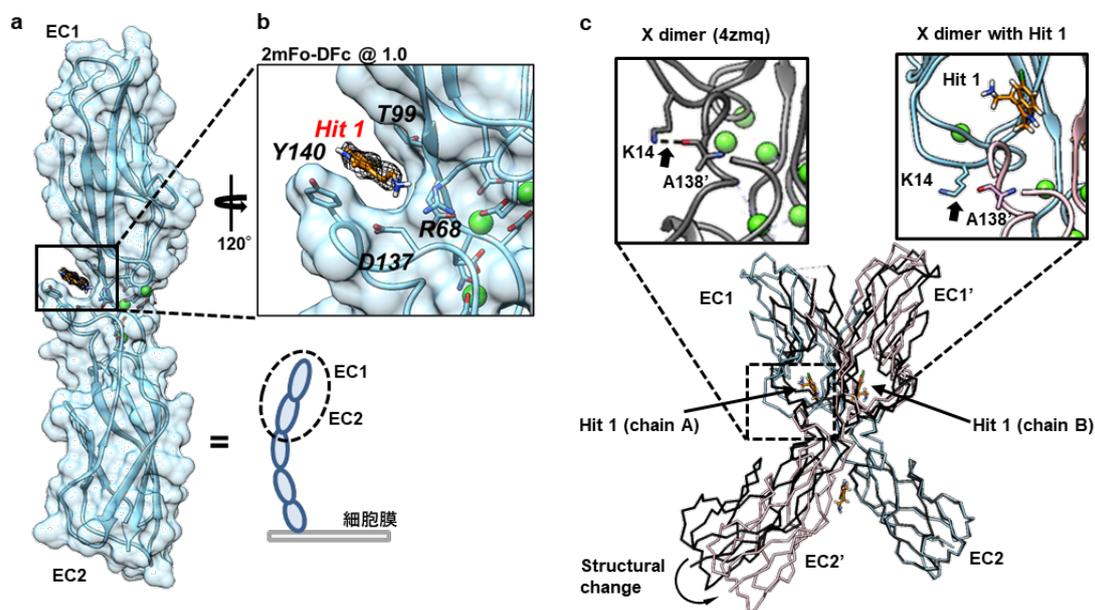


図3 Hit 1によるXダイマー阻害の構造基盤. (a) モノマー変異体とHit 1の複合体構造. (b) Hit 1結合部位の拡大図. (c) (upper panel) Xダイマー化に必要なK14-A138の水素結合がHit 1添加時には切断されていた. (lower panel) Hit 1が結合したXダイマー(grey)とHit 1が結合していないXダイマー(black)の比較.

続いて X ダイマーへの作用が確認できた Hit 1 に関し、実際の細胞接着を阻害するかどうかを細胞凝集アッセイにより確認した。Hit 1 の添加時には、濃度依存的に細胞凝集の形成が阻害された(図 4a, b)。一方で、一度形成させた細胞凝集に Hit 1 を添加しても再び細胞を分散させる効果はないことが明らかになった。以上の結果は、一連の細胞接着形成過程において、分子同士の最初の相互作用である X ダイマー化が極めて重要なチェックポイントであり、X ダイマー化の結合定数(on-rate)が細胞接着形成を支配しているパラメータであることを示唆している。この仮説を検証するために、X ダイマーの形成速度を測定する手法としてリポソーム凝集アッセイを実施した。リポソーム上に MEC12 を固定化し、カルシウムの添加をスイッチとして X ダイマーを形成させ、これに基づくリポソームの凝集を O.D.₆₅₀ をもとに測定した。その結果、Hit 1 存在時には、そうでない場合に比べ優位に X ダイマー形成速度が低下していることが明らかになった(図 4c)。以上の結果から、Hit 1 による X ダイマーの on-rate 減少効果と細胞接着形成制御への関与が強く示唆された。

Hit 1 は親和性、阻害活性ともにサブ mM オーダーと弱い。そこで、構造情報をもとにより高親和性・高阻害活性を有する化合物を設計することにした。モノマーと Hit 1 の複合体結晶構造から、Hit 1 のインドール骨格の 2 位の修飾が親和性に、5 位の修飾が阻害活性に重要であることが示唆された。この戦略に基づき、Hit 1-carboxylic acid および phenyl-Hit 1 を合成した。その結果、いずれの化合物も Hit 1 と同程度の結合親和性しか示さなかったものの、phenyl-Hit 1 においては顕著な X ダイマー化の on-rate 減少効果の向上と細胞凝集形成阻害活性の向上が確認できた(図 4c, d)。この結果は、先に述べた細胞凝集形成過程における X ダイマーの on-rate の重要性を支持する結果と考えられる。

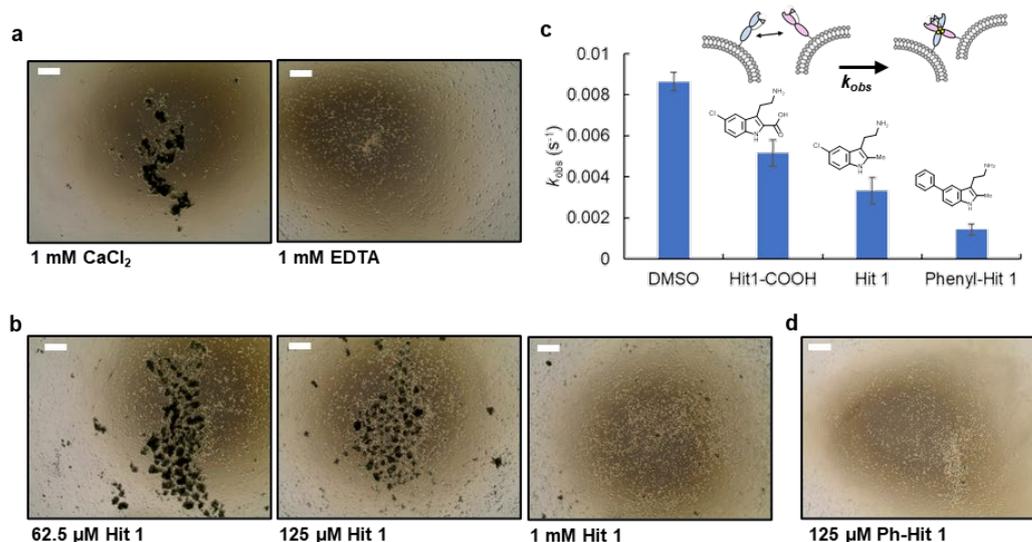


図4 Hit 1によるXダイマーのon-rate制御と細胞接着阻害。(a)細胞凝集アッセイのコントロール。Ca添加で細胞凝集が形成されるが、EDTA存在下では形成されない。(b) Hit 1濃度依存的な細胞凝集形成阻害。(c) リボソーム凝集アッセイにおける、MEC12を固定化したリボソームの形成速度。(d) Phenyl-Hit 1はHit1より10倍近く低濃度でも細胞凝集阻害能を示した。エラーバーは500 μm 。

第4章 結論・展望

本研究により P-カドヘリンのホモ二量体化を制御可能な新たなリガンド結合部位および低分子骨格が見出された。同結合部位への化合物の結合はホモ二量体化に重要な EC12 ドメインの構造変化を誘起し、相互作用界面を間接的に不安定化させる効果があることが示唆された。こうした“ドメイン間の窪み”はさまざまな接着分子においても確認でき、本研究で得られた知見があらゆる接着蛋白質の低分子による制御に重要な知見を与えると期待できる。また、X ダイマーの on-rate が P-カドヘリンの細胞接着形成過程を支配しているパラメータである可能性が示唆された。クラシカルカドヘリンにおける細胞接着形成過程のように、中間体を経る蛋白質複合体形成過程では一連の過程の最初の相互作用を速度論的に制御することが全体の行程の制御にも重要であると考えられる。またこの速度論的制御には必ずしも高親和性が要求されるわけでもないことも示唆された。仮に本標的が本質的に高親和性リガンドを生み出しにくいものだとすれば、こうした親和性に頼らない阻害戦略が同様の性質を保有する PPI の制御に対し新たな切り口を与えることが期待できる。

補足資料(実験手法)

1. 表面プラズモン共鳴(SPR)

化合物の直接結合を測定する系では、P-カドヘリンのモノマー変異体を Sensor Chip SA に SA-biotin capture 法によって固定化し、各化合物をセンサーチップ上に流した。ABA アッセイにおいては EC12 をアミンカップリング法により Sensor Chip CM5 に固定化した。化合物濃度は 500 μ M で、10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 0.05% Tween20, 5% DMSO のバッファーに溶解させた。

2. 蛋白質の結晶化および回折像の取得

P-カドヘリンのモノマー変異体、X ダイマーの結晶は 12.5 mg/mL に調整した蛋白質溶液を各結晶母液と 1:1 で混合し 20°C でインキュベーションすることによって得た。得られた結晶は 10% DMSO, 10 mM Hit 1 を含む結晶母液におよそ 10 分液浸することによって Hit 1 との複合体構造を得た。SPring-8 BL26B2 にて回折像を取得した。

3. リポソーム凝集アッセイ

脂質(DOPC: DOGs-NTA-Ni,9:1 molar ratio)へ 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl₂ バッファーを添加し、freeze-and-thaw およびフィルター処理によって均一なリポソームを得た。C 末端に His-tag を付加した MEC12 を作製し、リポソームに MEC12 をキャプチャーさせた。カルシウムの添加をトリガーとしてリポソーム凝集を開始し、O.D.₆₅₀ の上昇速度から MEC12 の X ダイマー化の速度を概算した。

4. 細胞凝集アッセイ

P-カドヘリンを強制発現させた CHO 細胞を樹立した。TC 処理⁹した細胞を 5.0×10^4 cells/well でプレートに播種し、カルシウムと化合物の添加後、凝集度合いを撮影した。細胞凝集 disruption アッセイにおいては予めカルシウムの添加によって細胞凝集を形成させた後、化合物を添加した。化合物は終濃度 2%DMSO を含む F-12 培地に溶解させた。

参考文献

- (1). Marsh, J. A., *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 551–575 (2015).
- (2). Scott, D. E. *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 533–550 (2016).
- (3). Imai K., *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **6**, 714–727 (2006).
- (4). Van Roy, F., *Nat. Rev. Cancer* **14**, 121–134 (2014).
- (5). Zhang, C. C. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **16**, 5177–5188 (2010).
- (6). Kudo, S., *et al.*, *Structure* **24**, 1523–1536 (2016).
- (7). Burden-Gulley, S. M. *et al.*, *Peptides* **30**, 2380–2387 (2009).
- (8). Nardone, V. *et al.* *J. Med. Chem.* **59**, 5089–5094 (2016).
- (9). Nose, A., *et al.*, *J. Cell Biol.* **103**, 2649–2658 (1986).